

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 774 988

②① N° d'enregistrement national : 98 01823

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 1/14

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 16.02.98.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 20.08.99 Bulletin 99/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦② Inventeur(s) : DESLYS JEAN PHILIPPE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ PROCÉDE DE PURIFICATION DE LA PRPRES A PARTIR D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET SES APPLICATIONS.

⑤⑦ Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour la détection qualitative et/ ou quantitative de la PrPres dans ledit échantillon.

Ledit procédé comprend essentiellement:

(1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension S1; (2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une microémulsion, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25; (3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g; et (4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une température égale ou supérieure à 80°C.

FR 2 774 988 - A1



La présente invention est relative à un nouveau procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour la détection qualitative et/ou quantitative de la PrPres dans ledit échantillon.

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles sont  
5 provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ANTC), encore appelés prions, dont la nature précise demeure inconnue à ce jour. Les ESST comprennent essentiellement la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (MCJ ou CJD pour Creutzfeldt-Jakob *disease*), la tremblante, chez le mouton et la chèvre et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou BSE pour *bovine spongiform*  
10 *encephalopathy*), chez les bovins ; d'autres encéphalopathies ont été mises en évidence chez le vison ou certains animaux sauvages, tels que le cerf et l'élan.

Ces maladies sont d'évolution constamment fatale et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement efficace.

Dans les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, il  
15 existe une accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP (ou protéine du prion), sous une forme anormale (PrPres), principalement dans le système nerveux central ; la PrPres copurifie avec l'infectiosité et son accumulation précède l'apparition des lésions histologiques. *In vitro*, elle est toxique pour des cultures de neurones.

Deux propriétés biochimiques permettent habituellement de distin-  
20 guer la PrPres de la PrP normale : la PrPres est partiellement résistante aux protéases et est insoluble dans les agents tensioactifs anioniques.

Pour pouvoir détecter la PrPres présente dans un échantillon, il est nécessaire de soumettre ce dernier à différentes opérations, pour enrichir ledit échantillon en PrPres, tout en éliminant la PrP normale, de manière à ce que la PrPres puisse  
25 ensuite être détectée par toute méthode spécifique appropriée, sans entraîner :

. de faux-positifs, dus à une présence de PrP normale ou d'autres contaminants, ou

. de faux-négatifs, dus à une concentration insuffisante de PrPres dans l'échantillon biologique final.

30 Dans ce but, un certain nombre de procédés d'isolement et/ou de purification de la PrPres ont été proposés. Ils sont essentiellement basés sur la méthode mise au point par Hilmert et Diringer (Nature, 1983, 306, 476-478) et

comprennent, de manière générale, une extraction par un détergent, des ultracentrifugations différentielles et un traitement par des enzymes protéolytiques (Multhaup G. et al., EMBO J., 1985, 4, 6, 1495-1501 ; Takahashi K. et al., Microbiol. Immunol., 1986, 30, 2, 123-131 ; Hope J. et al., EMBO J., 1986, 5, 10, 2591-2597 ; Grathwohl KUD et al., Arch. Virol., 1996, 141, 1863-1874 ; Kascsak RJ et al., Immunol. Investig., 1997, 26, 259-268 ; R.E. Race et al., J. Gen. Virol., 1992, 73, 3319-3323 ; Doi et al., J. Gen. Virol., 1988, 69, 955-960 ; T. Muramoto et al., Am. J. Pathol., 1993, 143, 5 1470-1479 ; Farquhar C.F. et al., Gen. Virol., 1994, 75, 495-504 et J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946). Ils ont l'inconvénient de comporter un nombre important d'étapes  
5 incluant plusieurs ultracentrifugations, qui sont lourdes à mettre en œuvre et entraînent des pertes cumulatives de PrPres, qui conduisent alors à une sensibilité insuffisante pour obtenir un seuil de détection et une quantification fines de la PrPres.  
10

Ces différentes méthodes nécessitent un appareillage de laboratoire de recherche et des temps de mise en œuvre, qui ne sont pas compatibles avec une  
15 utilisation sur le terrain, en particulier dans les abattoirs.

Or, il existe un besoin de vérification rapide de l'absence ou de la présence d'une encéphalopathie subaiguë spongiforme transmissible, au moment de l'abattage de l'animal.

En conséquence, l'Inventeur s'est donné pour but de pourvoir à un  
20 procédé de purification d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour une détection rapide et fiable de la PrPres, qui soit suffisamment simple à mettre en œuvre pour qu'il puisse être utilisé sur le terrain, et notamment dans les abattoirs et qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'Art antérieur.

En effet, le procédé selon l'invention :

- 25
- est simple à mettre en œuvre,
  - est fiable
  - est facile à interpréter : il augmente le seuil de sensibilité de détection de la PrPres, en éliminant les faux-positifs (PrP normale et autres contaminants) et il élimine les faux-négatifs, car il permet d'obtenir, en valeur absolue, une quantité  
30 importante de PrPres, puisqu'il est possible de traiter des quantités importantes de matériel biologique avec un rendement de purification supérieur à 80 % ; ceci est

particulièrement intéressant dans les abattoirs et fournit des échantillons dans lesquels la PrPres est facilement détectable avec des tests de diagnostic usuels.

La présente invention a pour objet un procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

(1) l'incubation pendant 30 secondes à 2 heures, de préférence pendant 30 secondes à 10 minutes, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif, en quantité comprise entre le quart et quatre fois, de préférence entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension micellaire ou lamellaire S1 opalescente à trouble ; n'importe quel agent tensioactif ou mélange d'agents tensioactifs, dans les conditions de température et de quantités précitées ne solubilisent pas la majorité de la PrPres, qui reste en suspension, alors que la PrP normale est solubilisée, voir détruite, en cas d'adjonction de protéase ; ladite incubation est de préférence réalisée à une température inférieure à 50°C, en présence d'une quantité d'agent tensioactif comprise entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique ;

(2) l'addition, à ladite suspension micellaire ou lamellaire S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une microémulsion, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ; on obtient ainsi une suspension S2 limpide à l'oeil nu ;

(3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la PrPres se retrouve dans le culot de centrifugation, avec un rendement de purification en PrPres compris, de manière surprenante, entre 80 et 100 % ; et

(4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une température égale ou supérieure à 80°C ; dans de telles conditions de température, les agents tensioactifs précités, de préférence les agents tensioactifs ioniques, solubilisent la PrPres.

Lesdites étapes (1) et (2) peuvent être réalisées simultanément ou successivement ; de préférence, elles sont réalisées successivement.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lorsque l'échantillon biologique est un tissu ou un organe, ce dernier est, préalablement à l'étape (1), homogénéisé, par exemple par broyage mécanique, dans un tampon d'homogénéisation, constitué d'un tampon neutre, tel que l'eau ou d'un tampon isotonique, tel que le glucose à 5 %.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la température mise en œuvre à l'étape (1) est comprise entre la température ambiante et 50°C ; elle est de préférence de 37°C.

De manière préférée, le tampon A comprend un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par :

- des tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, le taurocholate de sodium,
- des tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl sulfobétaïne), le SB 3-14, le SB 3-16 (hexadécyl sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS,
- des tensioactifs non-ioniques, tels que le C12E8 (dodécyl octaéthylène glycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween 80, le MEGA 9 (nonanoyl méthyle glucamine), l'octylglucoside, le LDAO (dodécyl diméthylamine oxyde) ou le NP40 ou
- des mélanges de tensioactifs tels qu'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif non-ionique et notamment le mélange SDS-Tween 80 ou le mélange de deux agents tensioactifs ioniques, tel que le mélange SDS-désoxycholate ou d'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif zwitterionique.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le tampon B est de préférence sélectionné parmi les alcools en C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> et les mélanges d'alcool dont la constante diélectrique théorique moyenne est comprise entre 10 et 25. Les alcools ou mélanges d'alcools suivants sont particulièrement préférés : butanol-1,

butanol-2, méthyl-2 propanol-1, isopropanol, isopropanol + pentanol, éthanol + hexanol, butanol + pentanol, etc...

On entend par constante diélectrique, au sens de la présente invention, la constante diélectrique statique  $\epsilon$ , mesurée dans des champs statiques ou à 5 fréquence relativement faible ; elle correspond au rapport déplacement électrique  $D$ /force du champ électrique  $E$ , lorsque un champ électrique est appliqué à la solution, à une température comprise entre 293,15 et 298,15 K.

La constante diélectrique des liquides, telle que définie ci-dessus, est plus particulièrement décrite dans CRC Handbook of Chemistry and Physics (Ed. 10 David R. Lide, 75<sup>ème</sup> édition, 1994, CRC Press).

Pour un mélange de solvants, on entend par constante diélectrique théorique moyenne, la moyenne des constantes diélectriques de chaque solvant, pondérée par sa proportion dans le mélange.

L'addition du tampon B à l'étape (2) permet, de manière surprenante, d'obtenir des rendements de purification supérieurs à 90 %, avec des conditions 15 de centrifugation à faible vitesse ; elle permet tout en maintenant un rendement important, de diminuer de manière significative la quantité de culot final ; de manière avantageuse, la quantité de culot final est de préférence inférieure à 10 % du poids d'échantillon biologique de départ pour permettre effectivement de l'utiliser dans le 20 cadre d'un dosage immunologique, alors que lorsqu'on ne rajoute que du tampon A, on se situe dans les conditions de l'Art antérieur, qui imposent une ultracentrifugation pour obtenir des rendements suffisant en PrPres, en vue d'une détection.

De manière préférée, le rapport rendement en PrPres dans la phase solide/quantité de culot récupéré après centrifugation de la suspension S2 est supérieur 25 à 10, lorsque l'échantillon de départ correspond à 100 mg de cerveau.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le tampon C mis en œuvre à l'étape (4) comprend en outre un agent chaotrope, tel que l'urée ; ledit tampon C est sélectionné, de manière préférée, dans le groupe constitué par les mélanges suivants : mélange SDS et urée ou mélange désoxycholate et urée. 30 De manière préférée, le SDS est à 0,25-1 % et l'urée est à 0,25-1 M.

Le tampon de Laemmli (SDS à 4 %, Tris-HCl 0,1 M pH 8, saccharose à 5 % et  $\beta$ -mercaptoéthanol à 2 %) peut également être utilisé, notamment pour les *Western blot*.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de la PrPres dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- le traitement dudit échantillon tel que défini ci-dessus,
- la dilution de l'échantillon obtenu si nécessaire et
- la détection de la PrPres par toute méthode analytique appropriée, telle qu'une méthode immunologique (ELISA, *Western blot*), produisant un signal spécifique.

L'étape de dilution précitée permet de neutraliser le tampon C, en vue d'une détection de la PrPres par une méthode ELISA ; elle est par exemple réalisée avec un tampon comprenant de l'albumine, conduisant à une concentration finale en albumine comprise entre 2 et 10 % (p/v).

Un échantillon biologique ainsi traité contient une concentration efficace en PrPres, de manière à ce que cette dernière puisse être détectée par toute méthode analytique, notamment une méthode immunologique, directement dans cet échantillon.

En variante, la présente invention a pour objet un procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

(1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, de préférence pendant 30 secondes à 10 minutes, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif, en quantité comprise entre le quart et quatre fois, de préférence entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension micellaire ou lamellaire S1 opalescente à trouble ;

(2) l'addition, à ladite suspension micellaire ou lamellaire S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une séparation de phase, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ;

(3) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (2), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la PrPres se retrouve à l'interface ;

(4) la récupération du film présent à l'interface ;

5 (5) la resolubilisation dudit film avec un tampon A sans protéase,

(6) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (5), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la PrPres se retrouve dans le culot de centrifugation, avec un rendement de purification en PrPres compris, de manière surprenante, 10 entre 70 et 100 % ; et

(7) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une température égale ou supérieure à 80°C ; dans de telles conditions de température, les agents tensioactifs précités, de préférence les agents tensioactifs ioniques, solubilisent la PrPres.

15 Les quantités de tampon B à ajouter pour obtenir une microémulsion ou une séparation de phase sont établies à l'aide d'une gamme de tampon B, comme illustré pour le butanol-1, à la figure 1 ; elles peuvent varier en fonction du tampon A et des constituants sélectionnés pour le tampon B.

La présente invention a également pour objet un kit de traitement 20 d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend outre un tampon d'homogénéisation dudit échantillon biologique, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un kit de détection de 25 la PrPres, caractérisé en ce qu'il comprend des quantités convenables de tampon d'homogénéisation de l'échantillon biologique dans lequel la PrPres doit être détectée, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C tels que définis ci-dessus, ainsi qu'au moins un anticorps anti-PrPres convenable.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore 30 d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :



- la figure 1 illustre l'influence de la quantité de tampon B (butanol) sur le rendement de purification de la PrPres (en %) et la quantité de culot obtenu après centrifugation ;

- la figure 2 illustre l'influence de différents tampons B sur le rendement de purification de la PrPres (en %) et la quantité de culot obtenu après centrifugation ;

- la figure 3 illustre le rôle de la constante diélectrique théorique moyenne, telle que définie ci-dessus, pour comparer différents mélanges d'alcools utilisés comme tampon B ;

- la figure 4 illustre un exemple de détection de la PrPres par *Western blot*.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de la PrPres sur le terrain : sélection de la quantité de tampon B convenable.**

- On prélève 500 mg de cerveau bovin ; on le broie et on l'homogénéise à 25 % (p/v) dans une solution de glucose à 5 %.

Pour réaliser l'homogénéisation, le prélèvement de cerveau (500 mg) et 1 ml de glucose sont introduits dans des tubes comprenant des billes en céramique, sous agitation. On récupère le surnageant (environ 1,5 ml) ; les billes sont rincées en suspension dans 500 µl de glucose et agitées ; on récupère le surnageant obtenu qui est mélangé avec le surnageant précédent (2 ml) ;.

- On incube 400 µl d'homogénat obtenu en 1) (équivalent à 100 mg de cerveau) avec 400 µl de tampon A comprenant un mélange à part égale à 25 % (p/v) de SDS et à 25 % (v/v) de Tween 80 dans un rapport 1/1 (v/v) ainsi que de la protéinase K (0,1 mg/ml de tampon A, soit 0,4 mg/g tissu) pendant 10 minutes (2 fois 5 min) à 37°C (étape (1)).

- On ajoute 0 à 1 000 µl de butanol (tampon B) (étape (2)).

La figure 1 montre le rendement de purification en PrPres (%), quantifié en *Western blot* et la quantité de culot (en mg) en fonction de la quantité de tampon B ajoutée.

Cette figure montre qu'entre 10 et 53 %, la PrPres est maintenue en suspension et qu'entre 30 et 50 % de butanol, on obtient un rendement de purification de l'ordre de 100 % et un culot inférieur à 10 mg.

- On centrifuge à 3 800 g (4 000 RPM, centrifugeuse JOUAN) pendant 10 minutes (étape (3)) ; on élimine le surnageant et on dissout le culot obtenu qui contient la PrPres avec 80-100  $\mu$ l d'un tampon C (étape (4)) comprenant :

- soit du SDS à 0,5 % et de l'urée 0,5 M,
  - soit un tampon de Laemmli,
- pendant 5 minutes à 100°C.

Ce traitement permet la dissolution de la PrPres ; l'échantillon est directement prêt à être utilisé dans un dosage de type immunologique tel que ELISA ou *Western blot*.

Pour réaliser un ELISA, le culot est de préférence dissous dans un tampon C comprenant du SDS (0,25-1 %) et de l'urée (0,25-1 M) ; l'échantillon obtenu sera de préférence dilué (au  $\frac{1}{4}$  ou au  $\frac{1}{2}$ ), après chauffage, avec un tampon contenant de l'albumine conduisant à une concentration finale en albumine comprise entre 2 et 10 % (p/v).

Dans le cas présent, la quantification de la PrPres est réalisée en *Western blot*, par mélange vol/vol avec du tampon de Laemmli ; l'échantillon dilué est ensuite déposé sur gel pour une détection par *Western blot* ; les quantités de PrPres détectées sont rapportées à une gamme linéaire de dilutions de PrPres purifiée dans les mêmes conditions que ci-dessus, à partir d'un même homogénat de cerveau de vache atteinte d'ESB, au stade terminal de la maladie (contrôle positif).

Les échantillons traités conformément au procédé selon l'invention, sont débarrassés du bruit de fond et permettent un dosage fiable, spécifique et quantitatif de la PrPres.

Le procédé selon l'invention permet d'augmenter le rendement de purification en PrPres, de manière significative :

. en effet, lorsque l'on ne rajoute que du tampon A, le rendement en PrPres n'est que de l'ordre de 40 % ; on observe donc une perte de l'ordre de 60 % de la PrPres, notamment du fait de sa répartition entre la phase solide et la phase liquide ; de plus, le culot est important. Ceci explique pourquoi dans l'Art antérieur, les protocoles décrits utilisent le sarkosyl qui entraîne l'obtention de culots plus faibles, mais  
5 qui impose des ultracentrifugations lourdes pour avoir un rendement suffisant.

. l'étape (2) permet d'augmenter le rendement en PrPres dans la phase solide : on obtient un rendement de l'ordre de 80-100 % dans la phase solide de la suspension S2, tout en diminuant la quantité de culot, comme précisé ci-dessus.

10 **EXEMPLE 2 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de la PrPres sur le terrain : variante de l'étape (1) et de l'étape (2).**

- l'étape d'homogénéisation est identique à celle décrite à l'exemple 1.

- ensuite, on incube les 2 ml d'homogénat obtenus à partir des 500  
15 mg de cerveau bovin, avec 2 ml de tampon A, dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1 (étape (1)).

- on ajoute 3 ml de tampon B, dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1 (étape (2)).

- la suite du procédé est identique à celui de l'exemple 1.

20 **EXEMPLE 3 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de la PrPres sur le terrain : variante de l'étape d'homogénéisation.**

- On prélève 250 mg de cerveau bovin ; on le broie et on l'homogénéise à 25 % (p/v) dans une solution de glucose à 5 %.

Pour réaliser l'homogénéisation, le prélèvement de cerveau (250 mg)  
25 et 750 µl de glucose sont introduits dans des tubes comprenant des billes en céramique, sous agitation, pendant 40 secondes (appareil RIBOLYSER-HYBAID) ; on prélève 400 µl de surnageant puis on procède comme à l'exemple 1.

**EXEMPLE 4 : Comparaison de différents tampons B sur le rapport rendement de purification en PrPres/quantité de culot.**

30 L'échantillon est traité dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1, à l'exception de la quantité de tampon B qui est de 600 µl.

La figure 2 illustre les rapports obtenus en *Western blot* avec différents tampons B : pentanol, butanol, mélange isopropanol + pentanol, mélange éthanol + hexanol, isopropanol et éthanol ; les mélanges ont été réalisés vol/vol.

**EXEMPLE 5 : Comparaison des constantes diélectriques de différents mélanges et leur influence sur le rendement de purification en PrPres et la quantité de culot.**

Le procédé est réalisé dans les conditions exposées à l'exemple 4.

La figure 3 illustre les résultats obtenus : dans le cas où le tampon B est un mélange d'alcools, le volume de chaque alcool est calculé en fonction de sa constante diélectrique et de la constante diélectrique théorique du mélange souhaitée (par exemple 17) et rapporter à 600 µl de volume total d'alcool. Par exemple, pour le mélange hexanol/éthanol on obtient la formule suivante :

$$13.y + 25 (1-y) = 17$$

y représentant le pourcentage d'hexanol, 13 étant la constante diélectrique de l'hexanol et 25 étant la constante diélectrique de l'éthanol.

Pour une constante diélectrique théorique moyenne de 15 ou moins, on observe une séparation de phase.

**EXEMPLE 6 : Détection de la PrPres par *Western blot*.**

\* Protocole :

1) incubation à 37°C, 2 fois 5 min de 400 mg d'homogénat de cerveau de vache à 25 % (poids/volume) et de 400 µl de tampon A comprenant 400 µl d'un mélange à part égale (v/v) de SDS à 25 % (p/v) et de Tween 80 à 25 % (v/v) (50/50) et de protéinase K (PK) à 0,1 mg/ml de tampon A.

2) on ajoute 600 µl de tampon B (sauf échantillons des pistes 7 et 8 : 1 000 µl tampon B), constitué de butanol-1.

3) on centrifuge à 15000 RPM pendant 5 min (environ 17 000 g).

4) le culot de centrifugation est repris dans 100 µl de tampon de Laemmli contenant 4 % de SDS et chauffé à 100°C pendant 5 min.

\* Western blot :

Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions

décrites par Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité).

Avant d'être déposés sur le gel d'électrophorèse, les échantillons ont été dilués au 1/20 dans un témoin négatif, produit dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1, à partir d'un homogénat de vache saine, en raison de l'importance des signaux. (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 10 mg (10 µl) de cerveau, correspondant à 9,5 mg de cerveau de vache saine et 0,5 mg de cerveau de vache infectée).

L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec l'antisérum JB007 (R. Demaimay et al., J. Virol, 1997, 71, 12, 9685-9689) au 1/5 000<sup>ème</sup>, et des Ig de chèvre anti-lapin conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est révélée par chimioluminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 4.

La figure 4 illustre les résultats obtenus et correspond à la courbe propanol/hexanol de la figure 3A.

A cette figure, les pistes 1 à 6 correspondent à des échantillons traités en mettant en œuvre comme tampon B, différents mélanges propanol/hexanol, conduisant à différents constantes diélectrique théoriques moyennes ; les pistes 8 et 9 correspondant à des échantillons biologiques soumis à une procédure mettant en œuvre comme tampon B, 1000 µl de butanol (point 53 % de la figure 1) : on observe dans ce cas que l'ensemble de la PrPres se retrouve à l'interface ; les pistes 9 et 10 correspondant à des échantillons biologiques soumis à une procédure mettant en œuvre comme tampon B, 600 µl de butanol (point 43 % de la figure 1) : on observe dans ce cas que l'ensemble de la PrPres se retrouve dans le culot (piste 10). alors que dans un témoin négatif, traité dans les mêmes conditions (piste 9), on n'observe aucun signal.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDECATIONS

1°) Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

5 (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension S1 ;

10 (2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une microémulsion, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ;

(3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g ; et

15 (4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une température égale ou supérieure à 80°C.

2°) Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

20 (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension S1 ;

25 (2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une séparation de phase, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ;

30 (3) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (2), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g ;

(4) la récupération du film présent à l'interface ;

(5) la resolubilisation dudit film avec un tampon A sans protéase,

(6) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (5), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g ; et

(7) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une température égale ou supérieure à 80°C.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lorsque l'échantillon biologique est un tissu ou un organe, ce dernier est, préalablement à l'étape (1), homogénéisé dans un tampon d'homogénéisation, sélectionné dans le groupe constitué par les tampons neutres et les tampons isotoniques.

10 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la durée d'incubation est de préférence comprise entre 30 secondes à 10 minutes.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le tampon A et/ou le tampon C comprend un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par :

15 - des tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl-sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, le taurocholate de sodium,

20 - des tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl-sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl-sulfobétaïne), le SB 3-14, le SB 3-16 (hexadécyl-sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS,

25 - des tensioactifs non-ioniques, tels que le C12E8 (dodécyl-octaéthylèneglycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween 80, le MEGA 9 (nonanoyl-méthylglucamine), l'octylglucoside, le LDAO (dodécyl-diméthylamine oxyde) ou le NP40 ou

- des mélanges de tensioactifs tels qu'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif non-ionique, un mélange de deux agents tensioactifs ioniques ou un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif zwitterionique.

30 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la température mise en œuvre à l'étape (1) est comprise entre la température ambiante et 50°C, de préférence à 37°C.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'étape (1), la quantité d'agent tensioactif présent dans le tampon A est de préférence comprise entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique.

5 8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le tampon B est sélectionné dans le groupe constitué par les alcools en C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> et les mélanges d'alcools dont la constante diélectrique théorique moyenne est comprise entre 10 et 25.

10 9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les alcools ou mélanges d'alcools suivants sont particulièrement préférés : butanol-1, butanol-2, méthyl-2 propanol-1, isopropanol, isopropanol + pentanol, éthanol + hexanol, butanol + pentanol.

15 10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la centrifugation de l'étape (3) et de l'étape (5) est de préférence réalisée à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le tampon C mis en œuvre à l'étape (4) comprend en outre un agent chaotrope.

20 12°) Procédé de détection de la PrPres dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- le traitement dudit échantillon selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,

- la dilution de l'échantillon obtenu, si nécessaire et

- la détection de la PrPres par toute méthode analytique appropriée.

25 13°) Kit de traitement d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend outre un tampon d'homogénéisation dudit échantillon biologique, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C, tels que définis aux revendications 1 à 11.

30 14°) Kit de détection de la PrPres, caractérisé en ce qu'il comprend des quantités convenables de tampon d'homogénéisation de l'échantillon biologique dans lequel la PrPres doit être détectée, des quantités convenables de tampon A, de



tampon B et de tampon C tels que définis aux revendications 1 à 11, ainsi qu'au moins un anticorps anti-PrPres convenable.

1/3

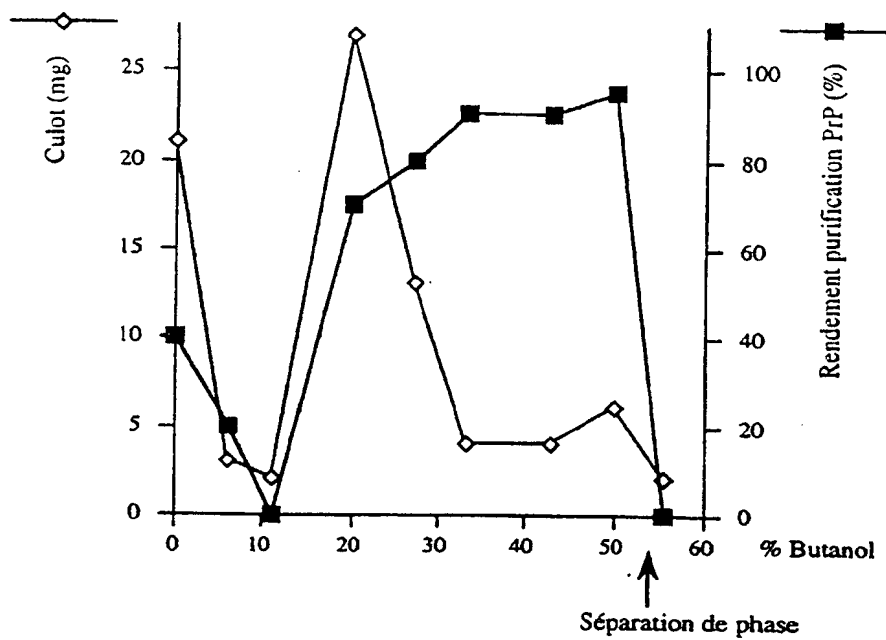


FIGURE 1

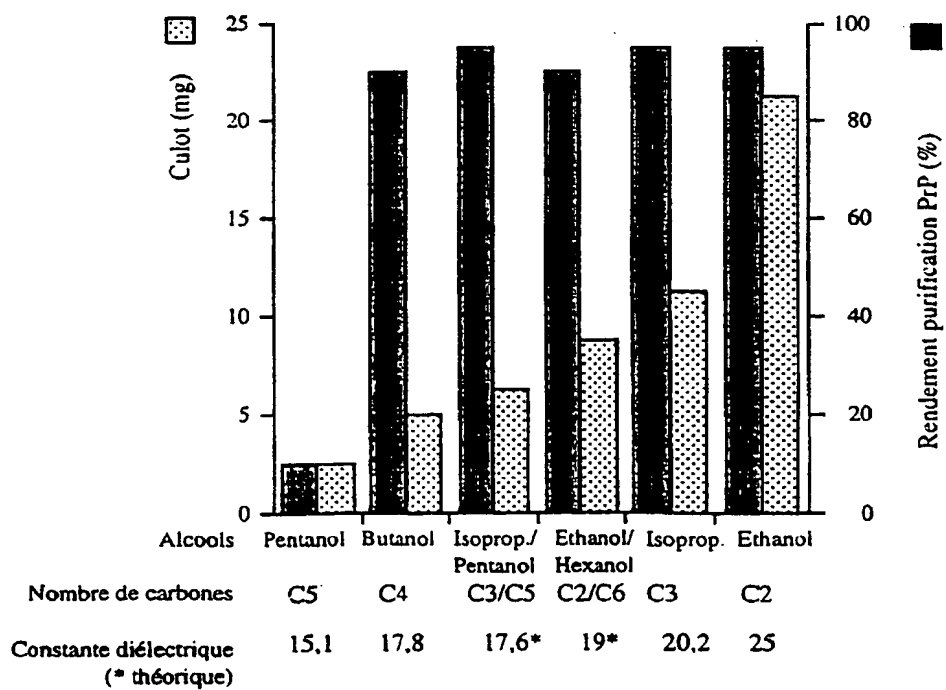


FIGURE 2

2/3

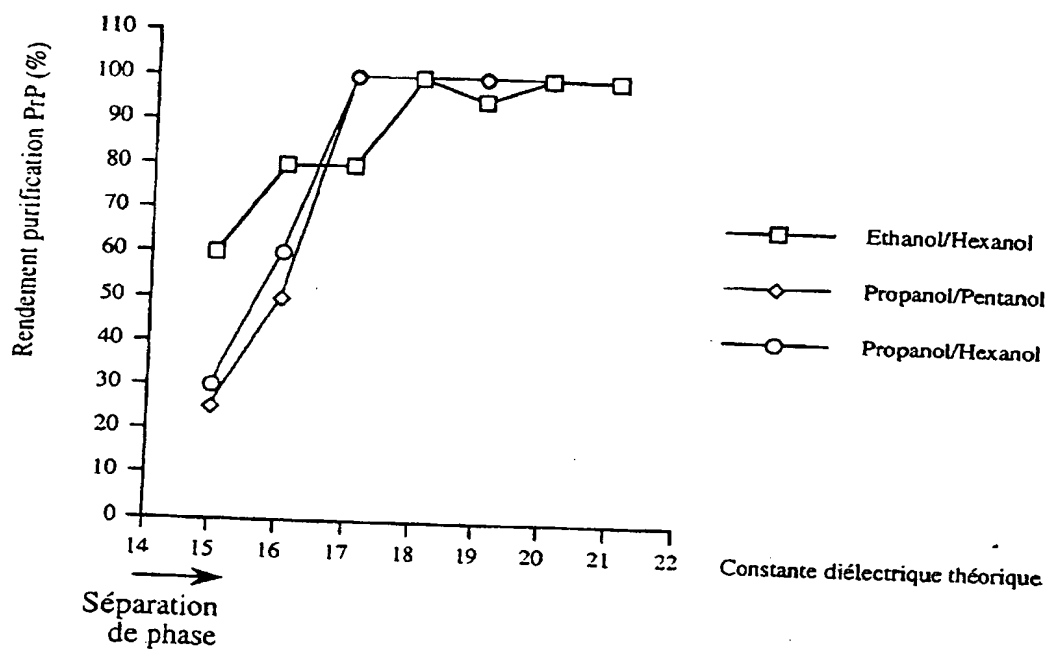


FIGURE 3A

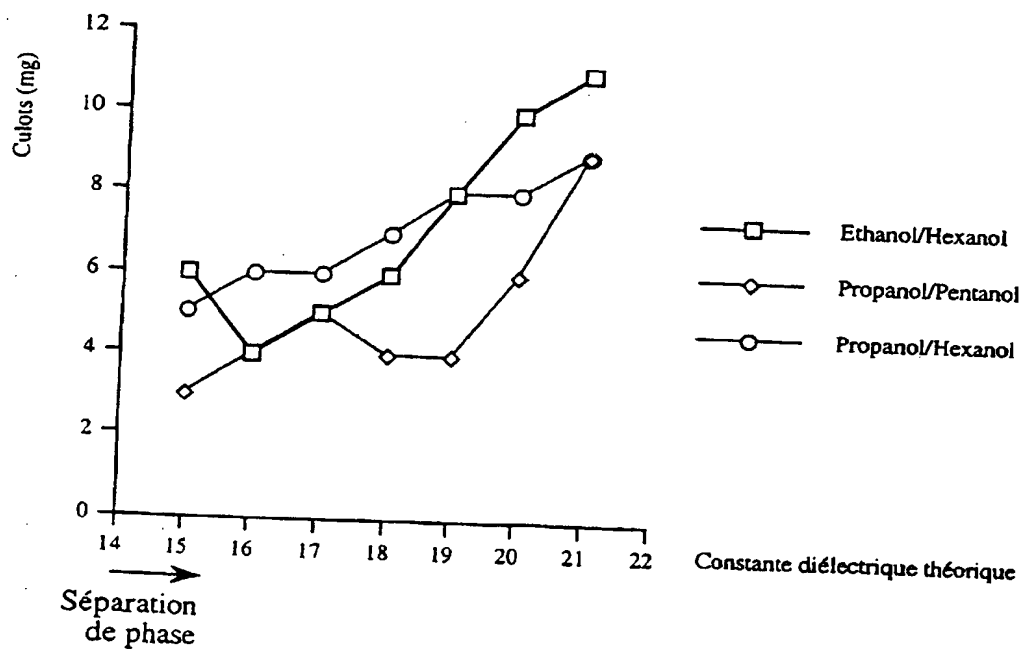


FIGURE 3B

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 556863  
FR 9801823

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes  | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|--|--|
| A   | File Medline, abstract 91140725, 1991<br>XP002084020<br>& M P MC KINLEY ET AL.: "Scrapie prion<br>rod formation in vitro requires both<br>detergent extraction and limited<br>proteolysis"<br>JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 65, no. 3, mars 1991, pages<br>1340-1351,<br>* abrégé * | 1-14   |
| T   | WO 98 30909 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE<br>ATOMIQUE) 16 juillet 1998<br>* page 7 - page 8 *  | 1-14   |
|   |  | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int.CL.6)     |
| Date d'achèvement de la recherche   |  | Examineur  |
| 11 novembre 1998  |  | Masturzo, P                                      |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br/>autre document de la même catégorie<br/>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication<br/>ou arrière-plan technologique général<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure<br/>à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date<br/>de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |  |  |

1  
EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)